

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-124092

(43)Date of publication of application : 11.05.1990

(51)Int.Cl.

G12N 9/64

G07K 13/00

G12N 1/19

G12N 1/21

G12N 5/10

G12N 15/57

// A61K 37/54

(G12N 9/64

G12R 1:19 )

(G12N 9/64

G12R 1:865 )

(G12N 9/64

G12R 1:91 )

(G12N 1/19

G12R 1:865 )

(G12N 1/21

G12R 1:19 )

(G12N 5/10

G12R 1:91 )

(21)Application number : **63-280045**

(71)Applicant : **FUJISAWA PHARMACEUT CO LTD**

(22)Date of filing : **04.11.1988**

(72)Inventor : **MAEDA MASAHIRO  
SATO SUSUMU  
NIWA MINEO  
ITO NOBUYUKI  
YAMASHINA IKUO**

---

**(54) PRODUCTION OF BATROXOBIN BY GENETIC RECOMBINATION**

**(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a gene-recombined batroxobin by constructing a manifestation vector containing DNA capable of coding amino acid sequence of batroxobin and culturing a host cell transformed thereby, etc.

**CONSTITUTION:** A DNA capable of coding a fused protein between batroxobin and another polypeptide is integrated into a manifestation vector functional in a coliform bacillus host cell and the coliform bacillus host cell is transformed by the resultant batroxobin manifestation vector. A desired transformant is selected and cultured to manifestate a batroxobin-containing fused protein. The manifested fused protein is then purified and subsequently cut, thus obtaining the desired batroxobin.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平2-124092

⑬ Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開 平成2年(1990)5月11日
C 12 N 9/64	Z	7823-4B	
C 07 K 13/00		8318-4H	
C 12 N 1/19		7421-4B	
1/21		7421-4B	
5/10			
15/57	ZNA	8717-4B C 12 N 15/00	A※
		審査請求 未請求 請求項の数 7 (金27頁)	

⑮ 発明の名称 バトロキシビンの遺伝子組換えによる製造法

⑯ 特 願 昭63-280045

⑰ 出 願 昭63(1988)11月4日

⑱ 発 明 者	前 田 昌 宏	大阪府豊中市浜1丁目24-25-302
⑱ 発 明 者	佐 藤 晋	大阪府豊能郡豊能町東ときわ台7丁目9番4
⑱ 発 明 者	丹 羽 峰 雄	京都府向日市上植野町切の口7-15
⑱ 発 明 者	伊 藤 信 行	京都府京都市北区西賀茂柿ノ木町19
⑱ 発 明 者	山 科 郁 男	京都府京都市左京区下鴨東森ヶ前町2
⑱ 出 願 人	藤沢薬品工業株式会社	大阪府大阪市東区道修町4丁目3番地
⑱ 代 理 人	弁理士 青 山 葆	外2名

最終頁に続く

明 細 書

産業上の利用分野

1. 発明の名称  
バトロキシビンの遺伝子組換えによる製造法
2. 特許請求の範囲
  1. 遺伝子組換えバトロキシビン。
  2. 天然のグリコシル化を伴わない請求項1に記載のバトロキシビン。
  3. グリコシル化されていない請求項1に記載のバトロキシビン。
  4. バトロキシビンのアミノ酸配列をコードするDNAを含有する発現ベクター。
  5. バトロキシビンと他のポリペプチドとの融合タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAを含有する請求項4に記載の発現ベクター。
  6. 請求項1または5に記載の発現ベクターを保持する形質転換体。
  7. 請求項6に記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からバトロキシビンを分離することからなるバトロキシビンの製造方法。
3. 発明の詳細な説明

本発明は、遺伝子組換え技術により製造されたバトロキシビンに関するものである。さらに詳しくは、バトロキシビンをコードするDNAを単離で、または他のポリペプチドをコードするDNAと共に含有する発現ベクター、該発現ベクターを保持する形質転換体、該形質転換体を用いてバトロキシビンを製造する方法、および該方法によって得られる遺伝子組換えバトロキシビンに関するものである。

従来技術および発明が解決すべき課題

天然バトロキシビンは、南米産ガラガラ蛇が産生するトロンビン様酵素タンパク質である。この物質は、フィブリノーゲンA鎖を特異的に切断して可溶性のフィブリンを生成する作用を有することから、循環器系疾患、例えば、心機能低下による血行障害、特に末梢血流の阻害等種々の疾患の予防および治療に有用である。

従来、天然バトロキシビンは、上記毒蛇の毒液から単離、精製して得る以外に入手法が知られて

いなかったために、安定的な供給に不安があり、また、高価であるという問題を有していた。

#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、バトロキソピンを安定かつ安価に供給するために、遺伝子組換え技術による該物質の製造を実用化することを目的として研究を重ねてきた。即ち、バトロキソピンをコードするDNAを適当な発現ベクターに組み込んでバトロキソピン発現ベクターを構築し、該発現ベクターによって宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培地に培養してその培養物から、バトロキソピンを単離することを試みた。

ところで、天然バトロキソピンをコードするDNA配列は、既に公知であり、例えば特開昭63-49084号公報にその推定アミノ酸配列とともに開示されており、該DNAは、寄託番号FERM P-8913の下、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)DH1(pBat-2)から常法通り単離されるプラスミドpBat-2を制限

することを見出した。即ち、バトロキソピンと他のポリペプチドとの融合タンパク質をコードするDNAを大腸菌宿主内で機能的な発現ベクターに組み込み、得られたバトロキソピン発現ベクターによって大腸菌宿主を形質転換し、所望の形質転換体を選択して培地に培養することにより、バトロキソピン含有融合タンパク質を発現させることに成功した。次いで、発現された融合タンパク質を精製後切断し、所望のバトロキソピンを他のポリペプチドから分離した。さらに、分離したタンパク質をリホルディングして生物学的に活性なバトロキソピンを得た。

一方、酵母やより高等な真核細胞、例えばマウスL929細胞に適合する発現ベクターを構築し、該ベクターを用いて適当な宿主を形質転換し、得られた形質転換体を培養してバトロキソピンを直接発現させることに成功した。この場合には、リホルディングを行わなくとも、生物学的に活性なバトロキソピンが得られる。

本発明の「遺伝子組換えバトロキソピン」とは遺

酵素処理することにより得ることができる。天然バトロキソピンをコードするDNA配列および推定のアミノ酸配列を第10図に示す。図中、アミノ酸番号24～1はプレプロ配列を、1～23は天然バトロキソピンのアミノ酸配列を表す。

バトロキソピンを遺伝子組換え技術によって製造するに際しては、種々の宿主ベクター系を利用することができる。人腸炎(エシェリヒア・コリ)や枯草菌(バチルス・サブチリス)等の原核生物、または酵母や哺乳動物のごとき真核生物由来の宿主、並びにそれらに適した発現ベクターは当業者に多数知られており、それらを適宜選択し、上記バトロキソピン遺伝子の発現に適するよう改良して用いることができる。

しかしながら、本発明者らは、バトロキソピン遺伝子が効率良く発現される宿主ベクター系の開発を目的として研究を重ねてきた結果、微生物宿主、特に大腸菌宿主の場合、直接発現法ではバトロキソピンは確認されなかったが、他のポリペプチドとの融合タンパク質としてならば発現され

る遺伝子組換え法により製造された天然のバトロキソピンおよびその誘導体を含む。ここで言う天然のバトロキソピンの誘導体とは、遺伝子組換え手法において、天然バトロキソピンをコードするDNAをDNAの付加、削除および置換により改変することにより、あるいはバトロキソピンをコードするDNAを発現させるに際し、宿主細胞を選択してグリコシル化の種類および程度を天然バトロキソピンと変えることにより製造可能な天然バトロキソピンの酵素活性を有する酵素を意味する。そのような例としては、天然バトロキソピンのN-末端にオリゴペプチド(例えば、GlyThrGluPheMet、SerGlePheMet等)が付加したバトロキソピン、天然のグリコシル化を伴わないバトロキソピン(例えば、グリコシル化されていない(糖鎖のない)天然バトロキソピン等)などが挙げられる。さらに、その誘導体には、下記の融合タンパク質のうち、バトロキソピン活性を有するものも含まれる。

また、原核細胞を宿主として用いて、バトロキ

ソビンを融合タンパク質として発現させる場合のバトロキソピンに融合させるべき他のポリペプチドの好ましい例としては保護ペプチドが挙げられる。ここで、保護ペプチドとは、バトロキソピンを遺伝子組換え手法で製造する際にバトロキソピンの発現を妨げるような作用(例えば、翻訳阻害作用)または発現されたバトロキソピンを分解するような作用(例えば、菌体内プロテアーゼによる分解作用)などの、バトロキソピンの製造に悪影響を与える作用からバトロキソピンを保護することができ、必要に応じて、例えば適当な酵素処理により、融合タンパク質から容易に脱離しうるポリペプチドを意味し、さらに、バトロキソピンに融合することにより融合タンパク質を大腸菌体内で不溶化せしめる能力を有することが望ましい。そのような保護ペプチドの好ましい例としては、ソマトメジンのC-ドメインを構成するペプチド(ペプチドCd)、アーインターフェロンのレフト・ハーフ部分(アーインターフェロンのアミノ酸配列: ~59番目に相当)を構成するペプチド(LH

塩が包含される。微生物の好ましい例は細菌、特にエシェリヒア属に属する細菌(例えば *E. coli* HB101 ATCC 33694、*E. coli* HB101 16 FERM BP-1872、*E. coli* MM294 ATCC 31446、*E. coli* DH1 ATCC 33849 等)および酵母(例えば *S. cerevisiae* AH22 ATCC 38626 等)であり、動物細胞の好ましい例はマウスL929細胞およびチャイニーズ・ハムスター・オvary(CHO)細胞等である。

通常、発現ベクターは、原核生物である細菌、特に大腸菌を宿主細胞として用いる場合には、少なくともプロモーター、開始コドン、バトロキソピンと他のポリペプチドとの融合タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および自己複製可能ユニット(単位)から構成される。後方、真核生物、即ち酵母や動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターは、少なくともプロモーター、開始コドン、シグナル・ペプチド、バトロキソピンのア

ミノ酸配列をコードするDNAおよび終止コドンから構成されるのが好ましい。さらにエンハンサー配列、バトロキソピンの5'-および3'-非コード領域、スプライシング・ジャンクション、ポリアダニル化部位および自己複製可能単位を挿入することもできる。

上記の発現ベクターの構成要素について説明すると、まず、自己複製可能単位には、形質転換体の選択マーカー(たとえば、アンピシリン耐性)が含まれていることが好ましい。

細菌を宿主として用いる場合、プロモーターという語句は、プロモーター、オペレーターおよびシャイン・ダールグーン(SD)配列(たとえばAAGG等)からなるプロモーター・オペレーター領域を意味する。そのようなプロモーターの例としては、信用のプロモーター・オペレーター領域(たとえば、ラクトースオペロン、PL-プロモーター、*trp*-プロモーター等)が挙げられる。酵母を宿主とする場合に用いられるプロモーターの例としては *pho5* プロモーターが挙げられる。哺乳動

物細胞における発現のため用いられるプロモーターの例としては、H T L V - L T R プロモーター、S V 4 0 初期および後期プロモーター、マウス・メタロチオニン I (M T) プロモーター等が挙げられる。

好ましい開始コドンとしてはメチオニンコドン (A T G) が挙げられる。

シグナル・ペプチドをコードする DNA としては p h o 5、t - P A およびバトロキソビンのシグナル・ペプチドをコードする DNA が挙げられる。

バトロキソビン、バトロキソビンと他のポリペプチドとの融合タンパク質またはシグナル・ペプチドのアミノ酸配列をコードする DNA は、たとえば、DNA 合成装置を用いて、部分または全 DNA を合成するか、あるいは形態転換体 [たとえば *E. coli* DH-1 (pBat-2) F E R M P-8 9 1 3 等] から得られるベクター [例えば、pBat-2 等] に挿入されている天然バトロキソビンの c D N A、またはゲノム DNA を常法通り処理する (たとえば、制限酵素による消化、細菌アルカリ

ホスファターゼによる脱糖酸化、T 4 ポリヌクレオチドキナーゼによる磷酸化、T 4 D N A リガーゼを用いたライゲーション) ことによって調製することができる。

終止コドンとしては慣用されている終止コドン (たとえば T A G、T G A、等) が挙げられる。

ターミネーター領域としては、天然または合成のターミネーター (たとえば、合成 fd ファージターミネーター、等) が挙げられる。

自己複製可能ユニットとは、それを含有する発現ベクターの全 DNA を宿主細胞中で自己複製しうる DNA 配列であって、天然のプラスミド、人工的に修飾したプラスミド (たとえば、天然プラスミドから調製した DNA 断片) および合成プラスミドが挙げられる。そのようなプラスミドの好ましい例としては、大腸菌を宿主細胞とする場合、例えばプラスミド p B R 3 2 2 またはその人工修飾体 (p B R 3 2 2 の適当な制限酵素処理によって得られた DNA 断片) が挙げられ、酵母を宿主細胞とする場合、例えば、p J D B 2 1 9、p J D B

2 0 7、p M M 1 0 2 が挙げられ、さらに、動物細胞を宿主細胞とする場合、例えばプラスミド p S V 2 d n f r A T C C 3 7 1 4 5、プラスミド p d B P V - M M T n e o A T C C 3 7 2 2 4、プラスミド p S V 2 n e o A T C C 3 7 1 4 9 が挙げられる。

エンハンサー配列としては、例えば S V 4 0 のエンハンサー配列が挙げられる。

ポリアデニル化部位としては、例えば S V 4 0 のポリアデニル化部位が挙げられる。

スプライシング・ジャンクションとしては、例えば S V 4 0 のスプライシング・ジャンクションが挙げられる。

細菌を宿主として用いる場合、本発明のバトロキソビン発現ベクターは、プロモーター、開始コドン、バトロキソビンと他のポリペプチドとの融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする DNA、終止コドンおよびターミネーター領域を、適当な自己複製可能ユニットと共に、上流から下流に向けて連続的に、所望により適当な DNA 断片 (例

えば、制限酵素認識配列を持つリンカー等) を用いて、常法 (例えば、制限酵素による消化、T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いた磷酸化、T 4 D N A リガーゼを用いたライゲーション) 通り環状に連結することにより調製される。動物細胞、特に哺乳動物細胞を宿主として用いる場合、本発明の発現ベクターは、エンハンサー配列、プロモーター領域、5' - 非コード領域、開始コドン、シグナル・ペプチドおよびバトロキソビンのアミノ酸配列をコードする DNA、終止コドン、3' - 非コード領域、スプライシング・ジャンクションおよびポリアデニル化部位を上記慣用の手法により、適当な自己複製可能ユニットに、上流から下流に向けて連続的かつ環状に連結して調製することができる。

次に、本発明の発現ベクターを選択した宿主細胞に導入する。当業者既知の常法 (たとえば、大腸菌の場合、クシュナー (Kushner) 法、酵母の場合、クレ (K U R) 法、動物細胞の場合、リン酸・カルシウム法、マイクロインジェクション法 等)

によって導入することにより、形質転換体を得られる。

次いで本発明の遺伝子組換えバトロキソピンを製造するために、得られた発現ベクター含有形質転換体を培地に培養する。

通常、培地は、炭素源(例えば、グルコース、グリセリン、マンニトール、フルクトース、ラクトース、等)および有機または有機の窒素源(例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼイン加水分解物、酵母エキス、ポリペプトン、バクトトリプトン、牛肉エキス、アミノ酸等)を含有する。所望により、他の成分、例えば、無機塩類(例えば、硫酸二水素ナトリウムまたはカリウム、硝酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム)、ビタミン類(例えば、ビタミンB<sub>12</sub>)、抗生物質(例えば、アンピシリン)等を培地に加えてもよい。

動物細胞用の培地としては、任意に成長促進物質及び/又は哺乳動物血清を供給された市販の培地を用いることができる。

ー等)を用いて行うことができる。酵母、動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、製造されたバトロキソピンは分泌され、通常、培養液中に活性体として存在するので、培養物を濾過(または遠心分離)することにより培養濾液(上澄液)を得、この濾液(上澄液)を上記した通常の方法で精製することができる。

上記において、大腸菌のような細菌が宿主細胞の場合、単離、精製した融合タンパク質を適当な酵素処理(例えば、血液凝固因子Ⅷ因子様ペプチドがバトロキソピンのN-末端に付加されている場合にはトロンピンによる処理)に付すことにより、保護ペプチドを脱離させ、目的物であるバトロキソピンを得る。

このようにして分離されたバトロキソピンをリホルディングすることにより、生物学的に活性なバトロキソピンが得られる。本発明者らはグリセリンの存在下、還元剤の非存在下でリホルディングすると、還元剤の存在下におけるよりもはるかに効率よくリホルディングされるという驚く

べき本発明の形質転換体の培養は、一般に、pH 5.5～8.5(好ましくはpH 7～7.5)、18～40℃(好ましくは25～38℃)において、5～50時間にわたって行えばよい。

次いで、形質転換体により発現されたバトロキソピンを分離する。大腸菌のような細菌を宿主細胞として用いる場合は、発現されたバトロキソピンと他のポリペプチドとの融合タンパク質は、通常、培養形質転換体細胞中に存在しているので、まず、細胞を濾過または遠心分離によって集め、細胞壁および/または細胞膜を常法(例えば、リゾチームおよび/または超音波による処理等)により破壊し、デブリスとする。このデブリスからの融合タンパク質の単離、精製は、天然または合成の蛋白質の精製、単離における一般的手法(例えば、適当な溶媒(例えば、8 M尿素水溶液、6 M Guanidinium 塩水溶液 等)による蛋白質の溶解、透析、ゲル濾過、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、および抗バトロキソピン抗体を用いるアフィニティクロマトグラフィー

べき事実を見出した。

上記製造法により得られた遺伝子組換えバトロキソピンは、循環器系疾患、例えば心臓病等の末梢血流の障害に起因する疾患の治療のための薬剤として有用である。本発明の遺伝子組換えバトロキソピンを治療に用いるためには、医薬として許容しうる塩と混合し、注射剤または注入剤のとき適当な投与剤形に製剤化し、ヒトを含めた哺乳動物に非経口的に投与する。

本発明のバトロキソピン製剤のための薬上作容し得る塩には、ペプチドまたは蛋白質(たとえば、血清アルブミン 等)を含有する医薬組成物の調製に慣用されている種々の有機または無機の塩体材料が含まれる。

本発明の遺伝子組換えバトロキソピンの投与方法および投与量は、既に市販されている天然バトロキソピンに準じて定めることができる。

本明細書においては、必要に応じて文頭名を括弧内に数字で記し、その詳細を明細書末尾の一覧表にまとめて示した。

本発明のバトロキソピン発現ベクターの構築および形質転換に用いた大腸菌、酵母および動物細胞を以下に説明する。

大腸菌 JM83(1)は、pUC18(ファルマシアより市販)を用いて合成オリゴマーをクロニングする際の形質転換実験における受容体として用いられた。大腸菌である菌株 DH1(2)および MM294(3)はその他のプラスミドを構築する際の形質転換実験における受容体として用いられた。HD101-16 FERM B P-1872は、HB101にMC4100(hlp16)由来のhlp16変異(4)を形質転換された菌株であり、異種遺伝子の発現実験の宿主として用いられた。

パン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)AH22 ATCC 38626(5)は、異種遺伝子の発現実験の宿主として用いられた。

培養動物細胞を用いた発現実験の宿主には、マウスL929(大日本製薬より市販)が用いられた。

本発明のバトロキソピン遺伝子の発現ベクター

トリプトファン・プロモーター;fd ter、fdファージ・ターミネーター;pho5 pro、pho5プロモーター;MT pro、マウスメタロチオネイン・プロモーター;LH、γ-インターフェロン・レポーター;C4、ソマトメジン-CのCDメイン;LPA、ヒト組織プラスミノーゲン活性化因子。なお、アミノ酸およびヌクレオチド類の略語は、当該技術分野で通常の方法に従った。

本発明の発現ベクターの構築にかかわるプラスミドは以下の通りである。pBat-2(第1図)は、pUC13のポリクロニング部位にあるEcoRI部位にBat-eDNAのEcoRI断片が挿入されているプラスミドである(6)。このプラスミドは形質転換体*E. coli* DH1(pBat-2)FERM B P-8913から常法により単離できる。pLS-D1(第1図)は、トリプトファン・プロモーター(Trp pro)の下流にLH-SMCの構造遺伝子及びfd ter、をクロニングした発現プラスミドである(7)。pLS-T2(第6図)は、Trp proの下流にSD配列を含有すると共に、LH-SM

の構築に用いられた酵素は市販されており、それらの主な供給源を以下に示す。

発現プラスミドの構築に際して用いられた制限酵素の内、CisIはパーリナー、NdeIはBRLからそれぞれ購入した。それ以外の制限酵素類は東洋紡から購入した。切断における反応条件は、添付の使用方法に従った。T4 DNAリガーゼ(ligase)、およびT4ポリヌクレオチドキナーゼ(polynucleotide kinase)は、宝酒造から購入した。DNAポリメラーゼ(polymerase)I[クレノウ断片(Klenow fragment)]は、BRLから購入した。バトロキソピンは持田製薬社製のものをを用いた。これらの酵素も全て、添付の使用法に従って用いられた。

以下の実施例および添付の図面で用いる略語は次の意味を有する:Amp、アンピシリン;Tc、テトラサイクリン;R、耐性;Bat、バトロキソピン;SMC、ソマトメジン-C;α-hANP、ヒト心房性ナトリウム排泄性利尿ホルモン;pro、プロモーター;ter、ターミネーター;Trp pro、

C遺伝子がポリシストロニックにクロニングされたプラスミドである(8)。pCLaHtrp3(第4図)は、Trp proの下流にC4-LHの遺伝子・α-hANPの構造遺伝子及びfd ter、をクロニングした発現プラスミドである(9)。pBR-PHO/lacZ(第7図)はpBR322に酵母のpho5遺伝子(発現制御・調節領域とシグナル配列を含む)と大腸菌のlacZ遺伝子をクロニングしたプラスミドである。pMM102(第7図)はpBR322のEcoRI部位に酵母由来の2μプラスミドをクロニングした大腸菌と酵母のシャトルベクターである。pST112(第8図)は、マウスのメタロチオネイン遺伝子のプロモーターの下流にヒト組織プラスミノーゲン活性化因子のcDNAがクロニングされた動物細胞での発現プラスミドである。このプラスミドは形質転換体*E. coli* DH1(pST112)FERM B P-1966から常法により単離できる。

本発明のバトロキソピン発現ベクターは全てプラスミドである。その内、プラスミドpBat-S



S19、pBat-SS50、pBat-SS51は原核生物、特に大腸菌属、好ましくはE.coli HB101-16を宿主として融合タンパク質を発現させるのに適し、プラスミドpMM107およびpMM105は真核生物、特に前者は酵母、後者はマウスL929細胞を宿主としてバトロキソピンまたは融合タンパク質を発現させるのに適している。

これらの発現ベクターは適当な大腸菌に挿入されて、それぞれ下記のとおり寄託番号の下、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

形質転換体	寄託番号
Escherichia coli HB101-16/pBat-SS49	FERM P-10324
Escherichia coli HB101-16/pBat-SS50	FERM P-10325
Escherichia coli HB101-16/pBat-SS51	FERM P-10326
Escherichia coli HB101-16/pMM105	FERM P-10327
Escherichia coli MM294/pMM107	FERM P-10328

以下に実施例を挙げ、本発明を詳しく説明する。

#### 実施例1 大腸菌の形質転換

本発明における大腸菌の形質転換は、特に明記しない限り、以下の条件および方法に従って行

して、4000×g、4℃で5分間遠心後、沈殿物を4μlのトランスフォーメーション・バッファーⅡ(TfⅡ)(10mM PIPES(あるいはMOPS)、75mM CaCl<sub>2</sub>、10mM RbCl、15%(v/v)グリセロール、1N KOHでpH 6.5に調整後、透過滅菌した)に穏やかに懸濁して氷冷下で静置した。15分後、0.2μlずつ分注したものを急速凍結して-80℃にて保存した。必要時に10分から15分間氷冷下で融解して以下のように用いた。10〜20μlのDNA溶液を加え、更に30分から45分間氷冷下で静置後37℃で3分間(受容体がhtrRの場合は42℃で90秒間)静置してヒートショックを行った。氷冷下で約90秒間静置後、0.8μlのy<sub>2</sub>培地を加え30℃あるいは37℃で1時間培養した後、選択培地「アンピシリン耐性株(Amp<sup>r</sup>)あるいはテトラサイクリン耐性株(Tc<sup>r</sup>)を選択する場合、それぞれAmp100γあるいはTc12.5γを含んだ滅菌し-寒天培地(バクトトリプトン10g、バクト酵母エキス5g、NaCl5g、寒天15g、

れた。

形質転換に用いる受容体を滅菌y<sub>2</sub>培地[バクトトリプトン(Bacto Tryptone)20g、バクト酵母エキス(Bacto yeast extract)5g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 5g、寒天(Agar)15g、H<sub>2</sub>O 1ℓ、1N KOHでpH 7.6に調整した]上で、30℃あるいは37℃で一晩培養した。上記プレート上で増殖したコロニーのうち単一の1個あるいは2個を5μlの滅菌y<sub>2</sub>培地(y<sub>2</sub>培地から寒天を除いたもの)に植置した。30℃あるいは37℃で約2時間培養後(O.D.<sub>550</sub>=0.3)、5μlの菌液を100μlの滅菌y<sub>2</sub>培地に植え継ぎ、更に同温で培養した。O.D.<sub>550</sub>が0.48になった時点で培養液を氷冷下で5分間静置後、4000×g、4℃で5分間遠心した。沈殿物を40μlのトランスフォーメーション・バッファーⅠ(TfⅠ)(30mM KOAc、100mM RbCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、50mM MgCl<sub>2</sub>、15%(v/v)グリセロール、0.2M AcOHでpH 5.8に調整後、透過滅菌した)に穏やかに懸濁した。氷冷下で5分間静置

H<sub>2</sub>O 1ℓ、1N NaOHでpH 7.4に調整した)]に塗布した。30℃あるいは37℃で一晩培養した。形質転換体からのプラスミドDNAの調製は、バーンボイム(Birnboim)らのアルカリ抽出法(10)に従って行った。

#### 実施例2 中間体プラスミドpBat-SS1の構築

夫々の制限酵素を、指示通りに使用してpBat-2[このプラスミドはE.coli DH-1(pBat-2)FERM P-8913より常法により単離できる]のEcoRI-NdeI断片(バトロキソピンの構造遺伝子を含む約1.6K塩基対(以下bpと略す))を調製した。

同様に、プラスミドpLS-D1(欧州特許出願公開公報第0219814号公報参照)のEcoRI-NdeI断片(大腸菌の複製開始点を含む約2.2Kbp)を調製した。

上記で得た2つのEcoRI-NdeI断片をT4 DNAリガーゼにより、ライゲートした。なお、以下の実施例でのDNA断片のライゲーションは

すべてT4 DNAリガーゼの存在下常法により行った。

次いで、実施例1記載の方法に従い、ライゲーション反応混合物で大腸菌MM294を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換体よりプラスミドpBat-SS1を分離して、EcoRI(1箇所切断)、EcoRI-BamHI(2箇所切断)、RsaI(3箇所切断)消化で目的のプラスミドが得られていることを確認した。

プラスミドpBat-SS1の構築模式図を第1図に示す。

### 実施例3 中間体プラスミドpBat-SS2の構築

#### 1)オリゴヌクレオチドの合成

本実施例および以後の実施例で用いるオリゴヌクレオチド①~⑭を、全自動DNA合成機(Model 381A, Applied Biosystems社製)を用い、その指示通りに合成した。

合成されたDNA部分の塩基配列を、マキサム-ギルバート法(1)により確認した。

#### 2)プラスミドpUC-BatL1の構築

##### (1)オリゴヌクレオチドのライゲーション

[A]オリゴヌクレオチド①、②、③、④をそれぞれ0.8nmolずつ混合し、エタノール沈殿に付した。乾燥後、T4オリゴヌクレオチドキナーゼにより各オリゴヌクレオチドの5'末端をりん酸化(以下、キナーゼ処理と称する)した後、ライゲーションさせた。

[B]オリゴヌクレオチド⑤、⑥、⑦、⑧、⑨、⑩、⑪、⑫、⑬、⑭をそれぞれ0.8nmolを混合してエタノール沈殿に付し、乾燥後、キナーゼ処理およびライゲーション反応を行った。

[C]上記[A]および[B]の反応溶液を混合して更に1時間ライゲーションさせた後、EcoRI消化を行い、得られた混合物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて所望の65bp断片を得た。

##### (2)プラスミドpUC-BatL1の構築

プラスミドpUC18をEcoRIおよびKpnI消化して得たDNA断片(1)で得た65bp断片とをライゲーション反応に付し、得られたライゲ-

これらのオリゴマーを以下の表1に示す。

表1 合成オリゴヌクレオチド

No.	塩基配列(5'→3')
①	AATTCATGGTCA
②	TTGAGGCT
③	GATGAATGTGACATAA
④	ATGAACATCCCTTTCCT
⑤	TGCAATTCATGTAC
⑥	ATGAATGCAAGGAAAG
⑦	GATGTTTCATTTATGTC
⑧	ACATTCATCACCT
⑨	CCAATGACCATG
⑩	AATTCATGGATGATCTGCGACTGTAGAAGCTGCAAGTGGTACC
⑪	TGGAGTGA
⑫	CCAATCACTCGAGGTACCACTTGCAGTTCTACAGTCGCGACAT
⑬	CATCATG

次いで、このオリゴヌクレオチドを用いて、SD配列とメチオニン開始コドンとの距離が適当な中間体プラスミドを構築した。

ーション反応混合物で大腸菌JM83を形質転換した。アンピシリン耐性を示す形質転換体を選択し、その形質転換体からプラスミドpUC-BatL1を分離し、EcoRI-PvuII、EcoRI-NdeI、EcoRI-RsaI、KpnI-PvuII、RsaI-PvuII消化により、所望のプラスミドであることを確認した。

#### 3)プラスミドpBat-SS2の構築

プラスミドpBat-SS1をRsaI部分消化(1箇所切断、反応条件:プラスミドDNA200μg(約45μg)に5倍濃度のRsaI緩衝液(50mM Tris-HCl(pH8.0)、35mM MgCl<sub>2</sub>、250mM NaCl、35mM 2-メルカプトエタノール、500μg/ml クシ血清アルブミン)60μlと酵素3μl(15ユニット)および蒸留水39μlを加えて37℃で1時間保温)し、次いで、EcoRI消化して得られた断片と、上記2)で得たプラスミドpUC-BatL1のRsaI-EcoRI断片(63bp)とをライゲーション反応に付した。得られたライゲーション反応混合物で大腸菌MM

294を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換体からプラスミドpBat-SS2を分離した。

EcoRI(1箇所切断)、RsaI(4箇所切断)、EcoRI-RsaIおよびEcoRI-BamHI消化により、目的のプラスミドであることを確認した。プラスミドpBat-SS2の構築模式図を第2図に示す。

**実施例4** 中間体プラスミドpBat-SS3の構築

プラスミドpLSD1をBamHI消化した後、DNAポリメラーゼI(クレノク断片)で平滑末端化処理した。さらにPstI消化を行い、約1.6 Kbpの断片を得た。

プラスミドpBat-SS2をPstI消化した後、HpaI部分消化(1箇所切断、反応条件:プラスミドDNA 200 μg(約18 μg)に5倍濃度のHpaI緩衝液[50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、35 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM KCl、35 mM 2-メルカプトエタノール、500 μg/ml ウシ血清アルブミン]50 μlと酵素5 μl(15ユニット)を

断片の調製

同様にしてプラスミドpBat-SS3の約2.35 KbpのEcoRI-PstI断片を調製した。

3)ライゲーション

実質上、実施例2の方法に従って1)で調製した約0.85 KbpのDNA断片を、2)で得た約2.35 KbpのDNA断片とライゲーションし、得られたライゲーション溶液で大腸菌DH1を形質転換した。アンピシリン耐性の形質転換体より、プラスミドpBat-SS10を分離して、EcoRI-PstI、ClaI-PstI及びHindIII-PstI消化により、目的のプラスミドであることを確認した。

プラスミドpBat-SS10の構築模式図を第4図に示す。

**実施例6** 融合タンパク質発現プラスミド、pBat-SS10を保持する形質転換体による融合タンパク質の発現

実施例5で調製したプラスミドpBat-SS10にて、実施例1の方法に従って、E. coli HB

を加えて37℃で1.5時間保温し、約1.5 Kbpの断片を得た。

上記で調製した約1.6 Kbpおよび約1.5 KbpのDNA断片をライゲーションし、得られたライゲーション反応混合物で大腸菌DH1を形質転換した。アンピシリン耐性の形質転換体からプラスミドpBat-SS3を分離し、BamHI(1箇所切断)、BamHI-EcoRIおよびEcoRI-SalI消化で目的のプラスミドであることを確認した。プラスミドpBat-SS3の構築模式図を第3図に示す。

**実施例5** ペプチドCドとバトロキニンとの融合タンパク質をコードする中間体プラスミドpBat-SS10の構築

1)プラスミドpCLaHtrp3tのEcoRI-PstI断片の調製

EcoRI-PstI消化を行いペプチドCドをコードする約0.85 Kbpをコードする断片を調製した。

2)プラスミドpBat-SS3のEcoRI-PstI

101-16 FERM BP-1872を形質転換し、pBat-SS10を保持する形質転換体を以下の発現実験に用いた。減菌しーAnp(アンピシリンを50 μg含むLB-プロス:LB-寒天培地から寒天を除いたもの)3%に細菌液、30℃で一晩培養し、菌液0.1 mlを新しい減菌しーAnp3%に植え継ぎ、30℃で培養した(前々培養)。約3時間後、0.5 mlの弱々培養液を50 ml LB-寒天培地に植え継ぎ、更に一晩30℃で培養した(前培養)。前培養液20 mlを400 mlの減菌培養液①[10倍濃度のM9保存液(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 15.2g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0g、NaCl 5g、NH<sub>4</sub>Cl 10g、H<sub>2</sub>O 1ℓ、10N NaOHでpH 7.4に調整)、②40%グルコース、③0.5%カザミノ酸、④塩酸チアミン10 μg/ml、⑤200 mM MgSO<sub>4</sub>、10 mM CaCl<sub>2</sub>、⑥Amp 5 μg/ml:①~⑥を別々に滅菌した後、③の溶液に、①を1/10量、②を1/80量、④を1/200量、⑤を1/100量、⑥を1/200量加えて調製]に接種し30℃で培養した。約3時間培養後(0.

D<sub>2</sub>O 0.6)、3-インドールアクリル酸(1 A A)を最終濃度10 $\mu$ gになるように本培養液に加えた。1時間から3時間の間で菌液を採取した。20~40 $\mu$ gの培養液を遠心分離にかけて、集菌した。集菌した菌体を光学顕微鏡で観察した結果、菌体内に不溶化したタンパク塊(inclusion body)が認められた。沈殿物に1/10量の10 mM PBS-25 mM EDTA (NaCl 8.0 $\mu$ g, KCl 0.2 $\mu$ g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 2.9 $\mu$ g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 $\mu$ g, EDTA (2Na) 3.73 $\mu$ g, NaOH 0.45 $\mu$ g, H<sub>2</sub>O 1 $\mu$ l, 10 N NaOHでpH 8.0に調整)を加えた。氷冷下で懸濁後、1分間の超音波処理を2回行った。30000 $\times$ gで30分間、4 $^{\circ}$ Cにおいて遠心分離した後、上清をPBS可溶性画分として保存した。沈殿物については更に8 M 尿素、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM EDTAを培養液の1/10量加えて懸濁した後、上記と同様の超音波処理を2回行った。30000 $\times$ g、30分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心分離した後、上清をPBS不溶性画分とし

て保存した。発現されたタンパク質の発現効率及び分子量の測定は、レムリ(Laemmli)の方法(12)に従ってSDS-PAGEで行った。15% SDS-PAGEの結果、PBS不溶性画分にベプチドCdとバトロキソピンとの融合タンパク質が高発現されていることが分かった。

またpBat-SS10を保持する形質転換体から発現された融合タンパク質の量は約40 $\mu$ g/1培養液であることが高速液体クロマトグラフィーから明らかとなった。

**実施例7** トロニン切断部位を有し、ベプチドCdとバトロキソピンとの融合タンパク質をコードしている発現プラスミド、pBat-SS49の構築

1) プラスミドpUC-BatL2の構築

(1) オリゴヌクレオチドのライゲーション  
実施例8、表1に記載のオリゴヌクレオチド②~⑥、⑧、⑩を用い、第X<sub>III</sub>因子様アミノ酸配列(トロニン切断部位)をコードするDNAを調製した。

以下のようにして合成オリゴマーのライゲーションを行った。

[A]: オリゴマー②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧をそれぞれ0.5 nmoi混合し、エタノール沈殿を行った。乾燥後、キナーゼ処理に付し、更にライゲーション処理を行った。

[B]: オリゴマー⑨、⑩をそれぞれ0.5 nmoi混合してエタノール沈殿に付し、乾燥後、キナーゼ処理を行った。

[C]: [A]の溶液と[B]の溶液を混合し、更に1時間ライゲーション処理を行った後、EcoRI消化に付した。その反応溶液を17.5%のポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける所望の、104 bpの断片を精製した。

(2) オリゴマーとプラスミドのライゲーション  
pUC18を制限酵素EcoRIおよびKpnI消化に付し、EcoRI-KpnI断片を得た。この断片と、1)、[C]で調製した104 bp断片とをライゲーションした。ライゲーション溶液で大腸菌JM83を形質転換し、アンピシリン耐性の形質

転換体からプラスミドpUC-BatL2を分離して、EcoRI-BamHI-BglI-PstI-PvuII、EcoRI-NdeI、EcoRI-HindIII、KpnI-PvuII及びXhoI-PvuII消化により、目的のプラスミドが得られていることを確認した。

2) プラスミドpUC-BatL1の構築

実施例4で得たプラスミドpBat-SS3のRsaI-BamHI断片(約0.6 Kbp)と、上記1)で得たpUC-BatL2のRsaI部分消化(1箇所切断、反応条件: プラスミドDNA 75 $\mu$ g(約90 $\mu$ g)に10倍濃度のRsaI緩衝液[100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、70 mM MgCl<sub>2</sub>、500 mM NaCl、70 mM 2-メルカプトエタノール、1 mg/ml クリスタリブアルブミン]15 $\mu$ lとRsaI 2 $\mu$ l(10ユニット)および蒸留水58 $\mu$ lを加えて37 $^{\circ}$ Cで40分間保温]し、得られた断片をBamHI消化して得た断片(約2.7 Kbp)とライゲーションした。ライゲーション反応の反応混合物で大腸菌MM294を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換体からプラスミドpUC-

Ba1 Iを分離し、HindⅢ、HindⅣ—BamH I、HindⅢ—RsaI、RsaI(4箇所切断)、RsaI—PvuⅡ、EcoR I—PvuⅡ、KpnI—PvuⅡ及びXhoI—PvuⅡ消化で目的のプラスミドであることを確認した。

### 3) プラスミドpBat—SS49の構築

プラスミドpBat—SS10のEcoR I—BamH I断片(約2.4 Kbp)とプラスミドpUC—Bat IのEcoR I—BamH I断片(約650 bp)をそれぞれ別箇に調製し、ライゲーションした。ライゲーションした溶液で大腸菌MM294を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換体よりプラスミドpBat—SS49を分離して、EcoR I—BamH I—PstI、EcoR I—HindⅢ、BamH I—HindⅢ、RsaI及びXhoI消化で目的のプラスミドが得られていることを確認した。

プラスミドpBat—SS49の構築模式図を第5図に示す。

**実施例8** トロンピン切断部位を有するLH蛋白とバトロキソピンの融合タンパク質をコード

R I部分消化[1箇所切断、反応条件:プラスミドDNA 40  $\mu$ g(約8  $\mu$ g)に5倍濃度のEcoR I緩衝液[50 mM Tris—HCl(pH7.5)、35 mM MgCl<sub>2</sub>、250 mM NaCl、35 mM 2—メルカプトエタノール、500  $\mu$ g/mlウシ血清アルブミン]40  $\mu$ gと酵素2  $\mu$ g(50ユニット)および蒸留水118  $\mu$ gを加えて37℃で1分間保温]した後、PstI消化を行いCd—LHをコードする約1.05 Kbp EcoR I—PstI断片を調製した。

### 3) ライゲーション

1)で得た約2.3 KbpのEcoR I—PstI断片と、2)で得た1.05 Kbpの断片をライゲーションし、ライゲーション溶液で大腸菌MM294を形質転換し、プラスミドpBat—SS50を構築した。他方、1)で得た約2.3 Kbp断片と2)で得た約1.05 Kbp断片をライゲーションし、同様に大腸菌MM294を形質転換することにより、プラスミドpBat—SS51を構築した。それぞれのアンピシリン耐性の形質転換体よりプラスミド

する発現プラスミドpBat—SS50、並びに、トロンピン切断部位を有する、LH蛋白、ペプチドCdおよびバトロキソピンの融合タンパク質をコードする発現プラスミドpBat—SS51の構築

### 1) プラスミドpBat—SS49のEcoR I—PstI断片の調製

pBat—SS49のEcoR I—PstI断片(約2.3 Kbp)を調製した。

### 2) プラスミドpL S—T2及びpCLaHtrp3tのEcoR I—PstI断片の調製

pL S—T2をEcoR Iで部分消化[1箇所切断、反応条件:プラスミドDNA 40  $\mu$ g(約40  $\mu$ g)に5倍濃度のEcoR I緩衝液(前述)40  $\mu$ gと酵素2  $\mu$ g(50ユニット)および蒸留水118  $\mu$ gを加えて37℃で10分間保温]した後、PstI消化を行い、所望の断片(約1.06 Kbp)を調製した。

他方、プラスミドpCLaHtrp3t(欧州特許出願公開公報第0206769号公報参照)をEco

pBat—SS50およびpBat—SS51を分離して、XhoI、EcoR I—PstI、HindⅢ—PstI及びClaI—PstI消化に付し、目的のプラスミドであることを確認した。プラスミドpBat—SS50およびpBat—SS51の構築模式図を第6図に示す。

**実施例9** トロンピン切断部位を有する融合タンパク質発現プラスミド、pBat—SS49、pBat—SS50およびpBat—SS51を保持する大腸菌からのバトロキソピンの発現

### 1) 形質転換および発現

実施例1記載の方法に従って標題の各プラスミドで大腸菌HB101—IGを形質転換し、得られた各形質転換体を実施例6と同様に培養し、実施例6記載のごとく処理してPBS可溶性画分とPBS不溶性画分を得た。15% SDS—PAGEを行い、タンパク質の発現効率及び分子量の測定を行った。その結果、pBat—SS49、pBat—SS50またはpBat—SS51を保持する大腸菌のPBS不溶性画分に、バトロキソピンの融

合タンパク質が高発現されていることを認めた。

また、それらの発現量はpBat-SS10の時と同様なレベル(約40 $\mu$ g/培養液)であった。

2) 形質転換体E.coli HB101-16/pBat-SS49、E.coli HB101-16/pBat-SS50またはE.coli HB101-16/pBat-SS51から発現された融合タンパク質の粗精製  
実施例6と同様に各形質転換体をそれぞれ別個3に培養(本培養液400 $\mu$ l)し、3-インドールアクリル酸を添加した後、2.5時間で全培養を12000 $\times$ g、10分間、4℃の遠心分離にかけて集菌した。集菌した菌体を光学顕微鏡で観察した結果、菌体内に不溶化したタンパク塊(inclusion body)が認められた。沈殿物に10mM PBS-25mM EDTA (pH 8.0)を8 $\mu$ lに加え、氷冷下で懸濁後、1分間の超音波処理を2回行った。30000 $\times$ g、20分間、4℃の遠心後、沈殿物に50%(v/v)グリセリン水溶液を10 $\mu$ l加えて上記と同様に超音波処理した。20000 $\times$ g、20分間、4℃の遠心の後、沈殿物に上記のグリ

セリン水溶液を加え、同様に洗浄した。20000 $\times$ g、20分間、4℃の遠心分離の後、沈殿物に8M 尿素-100mM Tris-HCl (pH 8.0)-25mM EDTA (pH 8.0)混液4 $\mu$ lを加えて上記と同様に超音波処理し、30000 $\times$ g、20分間、4℃の遠心分離により、上清を得た。この上清を、融合タンパク質の粗精製品として保存した。

実施例10 トロンビンによる融合タンパク質の消化によるパトリキソビンの分離

#### 1) 方法

実施例9、2)で調製した融合タンパク質の粗精製品5 $\mu$ lに、10mM Tris-HCl (pH 8.0)中トロンビン5 $\sim$ 8 $\mu$ l(1ユニット/ $\mu$ l)と精製水27 $\sim$ 30 $\mu$ lを加え、全量を40 $\mu$ lとした。大量に融合タンパク質を処理するときは、同じ割合で粗精製品、トロンビン及び精製水を混ぜ合わせればよい。37℃で約6時間反応させた後、SDS-PAGEによってトロンビンによる融合タンパク質の消化の有無を調べた。

#### 2) トロンビンの使用量および尿素濃度の影響

プラスミドpBat-SS49を用いて発現させた粗精製融合タンパク質を、種々の濃度の尿素の存在で上記1)の方法に従ってトロンビン消化し、トロンビンの量および尿素濃度の両者が消化効能に及ぼす影響を検討した。尿素濃度は8M、4M、2Mおよび1Mである。

その結果、2M尿素の存在下では、トロンビンを1ユニット用いた場合に融合タンパク質の消化が認められた。

1M尿素の存在下では、トロンビンを1ユニット用いただけで融合タンパク質の消化が認められ、10ユニット用いると融合タンパク質は完全に切断された。

この結果に基づき、以後のトロンビンによる消化反応は実施例10記載の融合タンパク質粗精製品5 $\mu$ l、トロンビン5 $\sim$ 8 $\mu$ l(1ユニット/ $\mu$ l)および精製水27 $\sim$ 30 $\mu$ lの割合で行った。pBat-SS10(トロンビン消化部位を持たない融合ポリペプチドを含有するプラスミド)、pBat-

SS49およびpBat-SS51を含有する形質転換体から得られた融合タンパク質を、それぞれトロンビンで処理した結果、血液凝固因子ⅩⅢ由来のアミノ酸配列を含むpBat-SS49または51を含有する形質転換体から得られた融合タンパク質のみに、トロンビンで消化された断片が観察された。

#### 3) トロンビン消化により生成したタンパク質のアミノ酸配列の決定

実施例9、2)に記載した方法によって大腸菌で発現された融合タンパク質(pBat-SS49で形質転換された形質転換体により発現されたもの)を上記1)のごとくにしてトロンビンによる切断反応に付し、得られた反応混合物を15% SDS-PAGEにかけた。目的のタンパク質を含有するゲル部分を切り出し、マックスフィールド(Max Field)(ATTO社製)を用いてゲルからタンパク質を溶出させた。溶出液を濃縮した後、高速液体クロマトグラフィー(YMC AP-302カラム、検出条件は210nm、流速1.0 $\mu$ l/min、溶出液

: 0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含む10-60%アセトニトリルを行い、メインピークを分取した。約20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の希出液約2  $\mu\text{l}$ をN末端アミノ酸配列の決定に用いた。試料全量をシーケンサー(Applied Biosystems社製 気相シーケンサー)の反応フィルター上で乾固し、エドマン反応(13)を行った。シーケンサーから得られたPTH(フェニルチオヒダントイン)-アミノ酸溶液を乾燥後、アセトニトリル溶液に溶かした。液体クロマトグラフ法を用いてアセトニトリル溶液中のPTH-アミノ酸を同定した。その結果、N末端からバリン-イソロイシン-グリシン-グリシン-アスパラギン酸と並んでいることが明らかとなった。この配列は、天然に存在する成熟バトロキソピンと同一である。即ち、トロピンにより特異的に血液凝固第XIII因子由来のアミノ酸配列が認識されて、消化されたことを意味する。このようにして決定された発現タンパク質のバトロキソピンのN末端付近のアミノ酸およびDNA配列を第9図に示す。

た。

#### 方法-A

上記リホルディング用タンパク質を $A_{400}=0.1$ になるよう、アルカリ緩衝液(50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 10.7、原薬を約0.8 M含有)に加えた。室温で1時間静置後、1 N HClを加えてpH 7とした。更に室温で1時間静置後、ウシ血清アルブミンを最終濃度0.1%になるように加え、得られた混合物を10 mM PBS-25 mM EDTA (pH 7)に対して透析した。4℃で一晩透析を行った後、透析内液のバトロキソピンを下記4)の方法によりラジオリガンドアッセイ(RIA)で測定した。

#### 方法-B (混合ジスルフィド法)

上記リホルディング用タンパク質を $A_{400}=0.02$ になるように緩衝液(50 mM Tris-HCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 9.0、使用前に真空中で15分間脱気した後、空素を数分間吹き込んだもの)に加えた。更にシステイン(Cys)を最終濃度3 mMになるように加えた後、室温で20

実施例 11 大腸菌宿主により発現されたタンパク質のリホルディングによる活性化

上記実施例10で消化して得たバトロキソピンをリホルディングした。

#### 1) リホルディング用タンパク質の調製

トロピンによる切断反応に付した融合タンパク質溶液0.8  $\mu\text{l}$ を15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2 mm厚)にかけてタンパク質を分離した。目的のタンパク質を含有するゲル部分を切り出し、約2 mm角に切り刻み、マックス・イールドを用いて電気泳動的にゲルからタンパク質を溶出させた。回収した溶出液に4倍量の冷アセトンを加えて-80℃で30分間静置した。2000  $\times$ g、20分間、-10℃で遠心分離した後、沈殿物を80%アセトンで洗浄し、真空乾燥した後、8 M尿素-100 mM Tris-HCl-25 mM EDTA (pH 8.0)溶液に溶解してリホルディング用タンパク質とした。

#### 2) リホルディング

以下のA~Eの各方法でリホルディングを行っ

時間静置した。水酢酸を加えてpHを4に調整し、室温で3時間静置した。ウシ血清アルブミンを最終濃度0.1%になるように加え、10 mM PBS-25 mM EDTA (pH 7)に対して透析した。4℃で一晩透析を行った後、透析内液のバトロキソピンを下記4)の方法によりRIAで測定した。

#### 方法-C

上記リホルディング用タンパク質を $A_{400}=0.2$ になるように緩衝液(100 mM Tris, 2 M塩酸グアニジン, 10 mM還元型グルタチオン, 1 mM酸化型グルタチオン, pH 8.5)に加えた後、室温で20時間静置した。水酢酸を加えてpH 6に調整し、室温で3時間静置した。ウシ血清アルブミンを最終濃度0.1%になるように加えて10 mM PBS-25 mM EDTA (pH 7)に対して透析した。4℃で一晩透析した後、透析内液のバトロキソピンを下記4)の方法によりRIAで測定した。

#### 方法-D (S-スルホン化法)

上記リホルディング用タンパク質を $A_{400}=$

0.05から0.2になるように緩衝液(25 mM ホウ酸ナトリウム、2 M 尿素、5 mM EDTA、2 mM 還元型グルタチオン、1 mM 酸化型グルタチオン、pH 8.5)に加えた後、室温で約20時間静置した。ウシ血清アルブミンを最終濃度0.1%になるように加えて50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (pH 7.8)に対して透析した。4℃で一晩透析を行った後、透析内液のバトロキシピンを下記4)の方法によりRIAで測定した。

#### 方法-E (希釈法)

上記リホールディング用タンパク質を0.5～2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように希釈緩衝液(50 mM Tris pH 8.0、20%グリセロール、150 mM NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.1  $\text{mg}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミン)に加えた後、室温で20時間静置した。次いで、緩衝液のバトロキシピンを下記4)の方法によりRIAで測定した。

上記A～Eの各方法によるリホールディングの結果を表2に示す。

まず、d)のチオール化合物の検討を随々行ったところ、E法にてチオール化合物(還元剤)を除くことにより、リホールディング効率は約2.3倍上昇した(0.70%)。

さらに上記のa)～c)について検討した。

まず、タンパク質量を $1 A_{280} = 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ として計算し、異種タンパク質濃度を変えて、DTTを含まない緩衝液を用いてリホールディングを行った結果、至適濃度は2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

さらに、緩衝液のpHを変えてリホールディングを行った実験において、最も高いリホールディング効果はpH 7付近で得られた。

最後に、タンパク質濃度を2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ としてpH 7で含まれるNaClの濃度を変えてリホールディングを行った。その結果、NaClの濃度を0 Mから0.6 Mと変化させるとリホールディング効果が約10倍上昇し、RIAで約3%の効率が得られた。

以上の結果から従来蛋白質のリホールディング法として知られている方法と比較して約100倍

表 2 リホールディング方法によるリホールディング効率の比較

方法	リホールディングしたバトロキシピン( $\text{ng}/\text{ml}$ )	リホールディング効率(%)
A	6.289	0.013
B	1.6	0.016
C	41.8	0.042
D	1.58	0.0016
E	0.92	0.33

表2から蛋白質のリホールディング法としては、各種文献既知の方法にてリホールディングを行った場合においては、最高で約0.04%の効率でバトロキシピンが得られた。更に大量のバトロキシピンを得るために以下の様な方法でリホールディングの条件を検討した。

#### 3)リホールディング条件の検討

2)で示したリホールディング方法Eの条件で新たなリホールディング方法を検討した。

一般的にリホールディング効率に影響を与える要因としては、a)異種タンパク質の純度及び濃度、b)pH、c)溶液のイオン成分、d)チオール化合物の存在の有無などが挙げられる。

の効率でリホールディングが成功し、その好ましい条件は、蛋白濃度1～5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、pH 6.5～8.5、NaCl濃度0.4～1.3 Mであることが分かる。

#### 4)リホールディングされたタンパク質の定量

次いで、上記のリホールディングされたバトロキシピンをラジオイムノアッセイ(RIA)で調べた。

リホールディングしたバトロキシピン試料、および様々な濃度のバトロキシピン標準(0.31、0.63、1.25、2.5、5、10、20  $\text{ng}/\text{ml}$ )各100  $\mu\text{L}$ と、アッセイ緩衝液(PBS-25 mM EDTA-0.5%ウシ血清アルブミン)400  $\mu\text{L}$ およびバトロキシピン抗血清(10<sup>4</sup>倍希釈液)100  $\mu\text{L}$ の混合物に<sup>125</sup>I-バトロキシピン(10<sup>5</sup>cpm/ $\mu\text{L}$ 、ヨードゲン(Iodogen)法(14)を用いて調製)100  $\mu\text{L}$ を加えて混合した液、4℃で一晩静置した。正常ウサギ血清(normal rabbit serum)100  $\mu\text{L}$ 、ウサギアグロブリン抗血清100  $\mu\text{L}$ および5%ポリエチレングリコール6



0.00C(9.0  $\mu$ l)を加えて混合した後、さらに4℃で静置した。約2.5時間後、3.000  $\times$  9、4℃、30分間の遠心分離を行って上清を除去し、パナコ・D Auto GAMMA Counterを用いて沈殿物の放射活性を測定し、バトロキソピンを定量化した。

**実施例12** リホールディングしたバトロキソピンタンパク質のトロピン様活性

実施例11で調製した、バトロキソピンタンパク質を用い、そのトロピン様活性をフィブリノーゲン・アガー・プレートにより測定した。

アガー(PBS中10  $\mu$ g/ml)5  $\mu$ lとウシ・フィブリノーゲン溶液(マイルスサイエンティフィック(Miles Scientific)社製) プラスミノーゲン不含有、PBS中0.4%)5  $\mu$ lを混合し、素早くプレートを作成した。プレート上に試料あるいはバトロキソピン標品(0.31、0.63、1.25、2.5、5、10、20  $\mu$ g/ml)を各10  $\mu$ lのせた後、37℃で一晩静置した。白濁した円の直径を測定し、バトロキソピンを定量した。

プラスミドpBat-SS17をKpnIおよびPstI消化後、約2.3 Kbpの断片を調製した。

(2) プラスミドpBR- $\Phi$ O/lacZのKpnI-PstI断片の調製

プラスミドpBR- $\Phi$ O/lacZをKpnIで部分消化(1箇所切断、反応条件:プラスミドDNA溶液40  $\mu$ l(約20  $\mu$ g)に5倍濃度のKpnI緩衝液[50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、35 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM KCl、35 mM 2-メルカプトエタノール、500  $\mu$ g/ml クシ血清アルブミン]20  $\mu$ lと酵素5  $\mu$ l(50ユニット)および蒸留水35  $\mu$ lを加え、37℃で30分間保温する)後、PstIで消化を行い、約3.5 Kbpの断片を調製した。

(3) ライゲーション

上記(1)および(2)で調製したDNA断片をライゲーション反応に付し、ライゲーション溶液で大腸菌MM294を形質転換した。アンピシリン耐性の形質転換体からプラスミドpBat-SS19を分離し、EcoRI-HindIII、BamHI、KpnI

のようにして上記リホールディング用タンパク質を方法-Eでリホールディングしたものは、トロピン様活性を回復していることが確認された。

**実施例13** 酵母における発現プラスミドpMM107の構築

1) プラスミドpBat-SS17の構築

実施例4で調製したプラスミドpBat-SS3をEcoRI消化した後、DNAポリメラーゼI(クレンコ断片)を用いて平滑末端化を行った。得られたDNA断片とキナーゼ処理を行ったKpnIリンカー(CGGTACCG)とをライゲーションした。ライゲーション溶液で大腸菌MM294を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換体からプラスミドpBat-SS17を分離し、EcoRIおよびKpnI消化で目的のプラスミドが得られていることを確認した。

2) プラスミドpBat-SS19の構築

(1) プラスミドpBat-SS17のKpnI-PstI断片の調製

I消化で目的のプラスミドであることを確認した。

3) 発現プラスミドpMM107の構築

(1) プラスミドpBat-SS19のPstI-BglII断片の調製

プラスミドpBat-SS19をPstIおよびBglIIで消化に付し、約4.2 Kbpの断片を調製した。

(2) プラスミドpMM102のPstI-BamHI断片の調製

プラスミドpMM102をBamHIおよびPstIで消化に付し、約8.6 Kbpの断片を調製した。

(3) ライゲーション

上記(1)および(2)で調製したDNA断片をライゲーション反応に付し、得られたライゲーション溶液で大腸菌MM294を形質転換した。アンピシリン耐性の形質転換体からプラスミドpMM107を分離し、EcoRI、HindIII、BamHI消化で目的のプラスミドであることを確認した。プラスミドpMM107の構築模式図を第7図に示す。

酵母におけるこの発現プラスミドpMM107

を用いて酵母A H 2 2を形質転換し、得られた酵母形質転換体により発現されたタンパク質のバトロキソピン末端付近の推定されるアミノ酸配列およびそれから推定されるプロセッシング部位を第9図に示す。

実施例14 発現プラスミドpMM107による酵母の形質転換

#### 1) 形質転換

上記実施例13で得た発現プラスミドpMM107を用い、木村らのKUR法(16)に従ってパン酵母A H 2 2を形質転換した。

ロイシンを含まない減菌最少培地[YMM(-Leu)]

培地: ① アミノ酸を含まないジフコ酵母変素ベース(Difco Yeast nitrogen base) 7g、凍末末20g/蒸留水880ml、② 40%グルコース、③ 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>バッファー、pH 7.5、④ H混合液(クラシル 0.4g、Trp 0.4g、His 0.4g、Arg 0.4g、Met 0.4g、Tyr 0.6g、Leu 0.6g、Ile 0.6g、Lys 0.6g、Val 3.0gおよびPhe 1.2gを

2.0g、アデニン 0.4g、蒸留水 934ml、⑤ 40%グルコース、⑥ 5% Asp溶液、⑦ 5% Thr溶液、⑧ ビタミン保存液(チアミン20mg、ピリドキシン20mg、ニコチン酸20mg、パントテン酸20mg、ピオチン0.2mgおよびイノシトール1gを蒸留水1ℓに溶かしたもの)、⑨ 微量元素保存液(H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 60mg、MnSO<sub>4</sub> 30mg、ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 300mg、CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 40mg、FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 250mg、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 25mgを蒸留水1ℓに溶かしたもの)、⑩ ①を別々に滅菌した後、①の溶液に、②を50ml、③を5ml、④を5ml、⑤を5ml、⑥を1mlそれぞれ加えて調整して洗浄した後、20mlの減菌本培養液に懸濁した。懸濁液全量を300mlの減菌本培養液に接種し、30℃で培養を続行した。6時間から12時間の間で菌液を採取した。20mlの培養液を1000×g、10分間、4℃の遠心分離にかけて集菌した。沈殿物に8mlの10mM PBS-25mM EDTA(前述)を加えて洗浄した後、1mlの10mM PBS-25mM EDTA-1m

蒸留水1ℓに溶解した混合液)、⑦ 5% Asp溶液、⑧ 5% Thr溶液、これら①～⑩を別々に滅菌した後、①の溶液に、②を50ml、③を10ml、④を50ml、⑤を5ml、そして⑥を5ml加えて調整してコロニーを形成した形質転換体を以後の発現実験に用いた。

2) プラスミドpMM107を保持するパン酵母A H 2 2からのバトロキソピンの発現、並びに活性の測定

以下の方法で形質転換体を培養した。

ロイシン非要求性の形質転換菌を10ml滅菌YMM(-Leu)液体培地[YMM(-Leu)]培地にから寒天末を除いたものに接種後、30℃で一晩培養した。菌液1.0mlを新しい滅菌YMM(-Leu)液体培地200mlに接種後、30℃で2日から3日間培養した(前培養)。組織した酵母を十分増殖させた後、前培養200mlを4000×g5分間の遠心分離で集菌した。菌体を40mlの滅菌本培養液[①MgSO<sub>4</sub> 0.5g、NaCl 0.1g、CaCl<sub>2</sub> 0.1g、KCl 1.0g、His 0.02g、Asa

M PMSFを加え、氷冷下で懸濁した後、ガラスビーズ(直径0.45mm)1gを加えた。ミキサーを用いて2分間激しく攪拌を行った。2回攪拌を行った後に1000×g10分間4℃の遠心分離を行い、上清を試料として保存した。

バトロキソピンが発現されていることを実施例11、4)記載の方法に従い、RIAにより確認した(1.3μg/2培養液)。また実施例12記載の方法に従い、フィブリノーゲン・アガー・プレートを用いた測定結果から、酵母から発現されたバトロキソピンの生物学的活性はRIA値とはほぼ同等であることが示された。

#### 3) 分子量の測定

酵母から発現されたバトロキソピンの分子量を以下の方法で推定した。

上記2)記載の発現実験において、本培養を10時間行なった試料を用い、以下のようにゼイモグラフィ(Zymography)を行って、酵母から発現されたバトロキソピンの分子量を推定した。

試料を1% SDS-PAGEにかけて分離し

た後、ゲルを2.5% Triton X-100水溶液(200 $\mu$ g)に浸した。室温で約3時間、穏やかに攪拌した後、塩素水で洗浄し、次いで、紙板上で乾かしてフィブリノーゲン・アガー・プレート(前述)上にのせ、37度で一晩保湿した。天然のバトロキニンBを比較試料として用い、同様に処理した。その結果、酵母から発現されたバトロキニンの場合には、30,000 $\pm$ 2000の分子量の位置に活性が検出された。

**実施例15** 動物細胞での発現プラスミドpMM105の構築

1) プラスミドpBAt-SS18の構築

実施例4で調製したプラスミドpBAt-SS3をEcoRIで消化した後、DNAポリメラーゼI(クレノク断片)を用いて平滑末端化した。得られたプラスミドと、キナーゼ処理を行ったBglIIリンカー(CAGATCTCG)とをライゲーションした。ライゲーション溶液で大腸菌MM294を形質転換した。アンピシリン耐性の形質転換体からプラスミドpBAt-SS18を分離し、BglII

消化で目的のプラスミドであることを確認した。

2) プラスミドpST-XhoIの構築

プラスミドpST112[プラスミドpST112を含む形質転換体*Escherichia coli* DH1( $\alpha$ pST112)は菌工研発第1966号として寄託されている]をSmaI消化して得た断片と、キナーゼ処理を行ったXhoIリンカー(CCTCGAGG)とをライゲーションした。ライゲーション溶液で大腸菌MM294を形質転換した。アンピシリン耐性の形質転換体から所望のプラスミドpST-XhoIを分離し、XhoI消化により、目的のプラスミドであることを確認した。

3) 動物細胞における発現プラスミドpMM105の構築

(1) プラスミドpBAt-SS18のBglII-XhoI断片の調製

プラスミドpBAt-SS18をBglIIおよびXhoIで消化した後、約0.7 Kbpの断片を調製した。

(2) プラスミドpST-XhoIのBglII-XhoI断片の調製

プラスミドpST-XhoIをBglIIおよびXhoIで消化し、約5.8 Kbpの断片を調製した。

(3) ライゲーション

上記(1)および(2)で得たDNA断片をライゲーション反応に付し、その反応溶液で大腸菌MM294を形質転換した。アンピシリン耐性の形質転換体からプラスミドpMM105を分離し、EcoRI、HindIII、EcoRI-HindIII消化によって目的のプラスミドであることを確認した。

プラスミドpMM105の構築模式図を第8図に示す。

取得した目的のプラスミドpMM105で培養動物細胞マウスL929を形質転換し、得られた形質転換体により発現されたタンパク質のバトロキニンB末端付近の推定アミノ酸配列および推定されるプロセッシング部位を第9図に示す。

**実施例16** 発現プラスミドpMM105による培養動物細胞の形質転換と発現

1) 形質転換

培養動物細胞の形質転換はグラハム(Graham,

F.)らのリン酸カルシウム共沈法(17)に従って行なわれた。即ち、プラスミドpSV2neoATCC37198(0.1 $\mu$ g)とプラスミドpMM105(3.0 $\mu$ g)による同時形質転換を行った。

マウスL929細胞を直径10cmの培養ディッシュ中10%胎児血清を含むダルベッコMEM培地(DMEM)で培養したものに、発現プラスミド(pMM105)とマーカープラスミド(pSV2neo)とをリン酸カルシウムにて共沈させたものを加えた。CO<sub>2</sub>インキュベーター中で一晩培養後、培養液を新しい非選択培地(前出DMEM)に変えて更に一晩培養した。次に培養液を選択培地(G418(GIBC社製)500 $\mu$ g/mlを含むDMEM)に交換して24~48時間培養した後、選択培地で96ウェルのプレートに細胞を分割(1 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞/100 $\mu$ l培地/ウェル)した。3日あるいは4日後に選択培地にて培地交換を行いながら培養を続けた。

2) プラスミドpMM105を保持する形質転換体からのバトロキニンの発現

上記1)において選択増殖してきた細胞を用い、バトロキソビンの発現状況を調べた。

96ウェルのプレート上で細胞増殖の観察されたウェル中の培地をメタロチオネインプロモーターの誘導用培地(2mM 酪酸ナトリウム、40  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、2%胎児血清を含むDMEM)と交換し、24時間培養した。培養液中のバトロキソビン活性をRIAにより測定し、最も高い産生量(約10  $\mu$ g/2培養液)を示した細胞をバトロキソビン産生細胞として選択し、MM105と名づけた。

3)培養動物細胞から発現された融合タンパク質の精製

上記2)に記載のMM105(バトロキソビン産生能を有する、形質転換されたマウスL929細胞)をクローニングすることによって更に高産生株を所得した。約50~100  $\mu$ g/2培養液の産生能を有する形質転換株を用いて、約400  $\mu$ gの培養を行った。培養液を12000×g、10分間、4℃の遠心分離にかけ、上清をバトロキソビ

ン抗体をカップリングさせたゲルによるアフィニティクロマトグラフィーにかけて精製した。バトロキソビン約13.8  $\mu$ gを含有する培養上清から抽出緩衝液(0.2M グリシン-HCl、0.5M NaCl pH 2.0)により、約12  $\mu$ gのバトロキソビンを精製・回収した。アフィニティクロマトグラフィーの抽出液を15% SDS-PAGEで調べたところ、バトロキソビン標品と泳動度が一致するところにメインバンドが存在していた。

上記に用いたアフィニティ・カラムは、以下のごとくにして作成された

バトロキソビン抗血清(家兎を用いて調製)9  $\mu$ lにPBSを等量加え、さらに飽和硫酸アンモニウム溶液を9  $\mu$ l加えて4℃で1時間攪拌した。4℃で3.5時間静置した後、20000×gで30分間遠心し、沈殿物を20mM リン酸緩衝液(pH 8.0)2  $\mu$ lに対して一晩透析した。透析内液を20mM リン酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄したDEAEセロース・カラムを用いて精製し、バトロキソビンの粗精製抗体約35.4  $\mu$ g/3.2  $\mu$ gを得た。

その内20  $\mu$ g分(1.8  $\mu$ g)をカップリング緩衝液(0.1M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.0)に対して透析した。透析内液にあらかじめ1mM HCl 300  $\mu$ lで膨潤、洗浄したB/CN-活性化セファロース4B(ファルマシア社製)1.2  $\mu$ g相当(約5  $\mu$ gゲル)加え、室温で2時間攪拌した。さらにゲルをブロッキング試薬(0.2M グリシン pH 8.0)と共に2時間攪拌後、カップリング緩衝液(前述)と0.1M 酢酸緩衝液(pH 4.0)で交互に洗浄し、PBSに懸濁して保存した。

4) L929から発現されたタンパク質のウエスタン・ブロッティングによる確認

上記3)におけるSDS-PAGEによって得られたメインバンドがバトロキソビンであることを確かめるために以下の方法でウエスタン・ブロッティングを行った。

SDS-PAGEをかけたゲルに0.45  $\mu$ mのメンブランフィルター[Schleicher & Schell社製 BA85、フィルターをあらかじめトランスファー緩衝液(Tris 6.06g、グリシン 2.8、

8g、メタノール400  $\mu$ l、水を加えて全量を2  $\mu$ lとする)に浸し、完全に気泡を抜いておく]を重ね、トランスブロッティング装置(バイオラッド社、TRANS BLOT)を用い、60mAで1時間電気泳動後、120mAで一晩電気泳動を行った。フィルターを3%ゼラチン溶液(TBS緩衝液(Tris 4.84g、NaCl 5.84g、2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O、1  $\mu$ l HCl pH 7.5)に調整)を用いて調整に1時間浸した後、バトロキソビン抗体を含む1%ゼラチン溶液に交換した。約1時間半後、0.05% Tween 20溶液(TBS緩衝液を用いて作成)でフィルターを洗浄した。5分間の洗浄を3回、10分間の洗浄を1回行った後、POD標識されたラビビットIgGを含む1%ゼラチン溶液に約1時間浸した。0.05% Tween 20溶液で5分間の洗浄を2回、10分間の洗浄を2回行った。A液[5  $\mu$ g/mlメタノールに発色試薬(西洋ワサビのペルオキシダーゼ発色剤(Horseradish peroxidase color development)試薬)15  $\mu$ gを溶かしたもの]とB液(2.5  $\mu$ g/ml TBS緩衝液に15  $\mu$ gの30%過

酸化水素を加えたものをそれぞれ使用直前に調製して混合した後、フィルターに加えて発色させた。その結果、3)で得た標品と同一の泳動度を示したメインバンドは標品と同様に発色し、バトロキソピンであることが確かめられた。

本明細書で引用した文献を以下に示す。

#### 参考文献

1. メッシング(Messing, J.)(1979) Recombinant DNA Technical Bulletin, NIH Publication No. 79-99, 2, No. 2, 43-48
2. ハナハン(Hanahan, D.)(1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580
3. メセルソン(Messelson, M.)およびユン(Yuan, R.)(1968) Nature 217, 1110-1114
4. トベ(Tobe, T.), イトウ(Ito, K.)およびユラ(Yura, T.)(1984) Mol. Gen. Genet. 195, 10-16
5. カーン(Kurian, J.)およびヘルスコヴィツ

65, 499-560

12. レムリ(Lacelli, U. K.)(1970) Nature 227, 680-685

13. チェン(Chang, J. Y.), クレーザー(Cresser, E. H.)およびベントリィー(Bentley, K. W.)(1976) Biochem. J. 153, 607-611

14. サラシンスキー(Salaciński, P. R.), マクリーン(McLean, C.), サイクス(Sykes, J.)クレメント・ジョーンズ(Clement-Jones, V.)およびローリー(Lowry, P. J.)(1981) Anal. Biochem. 117, 136-146

15. ハーガー(Hager, D. A.)およびバージェス(Burgess, R. R.)(1980) Anal. Biochem. 109, 76-86

16. ハンセント(Hashimoto, H.)およびキムラ(Kimura, A.)(1985) Hakkou-to-Kogyo(in Japanese) 43, 630-637

17. グラハム(Graham, F. L.)およびファン・デア・イグ(van der Eb, A. J.)(1973)

プ(Herskowitz, I.)(1982) Cell 30, 933-943

6. イトウ(Ito, N.), タナカ(Tanaka, N.), ミハシ(Mihashi, S.)およびヤマシナ(Yamashina, I.)(1987) J. Biol. Chem. 262, 3132-3135

7. および8. 欧州特許出願公開報第0219814号公報

9. サイトウ(Saito, Y.), イシイ(Ishii, Y.), コヤマ(Koyama, S.), ツジ(Tsujii, K.), ヤマダ(Yamada, H.), テライ(Tera, T.), コバヤシ(Kobayashi, M.), オノ(Oono, T.), ニワ(Niwa, M.), ウエダ(Ueda, I.)およびクチ(Kikuchi, H.)(1987) J. Biochem. 102, 111-122

10. バーンボイム(Birbaumer, H. C.)およびドーリー(Dolly, J.)(1979) Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523

11. マキサム(Maxam, A.)およびギルバート(Gilbert, W.)(1980) Methods Enzymol.

Virology 52, 456-467

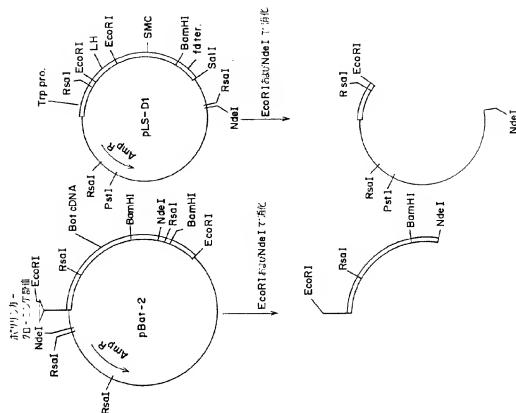
4. 図面の簡単な説明

第1図は、pBat-S S 1の構築模式図、第2図はpBat-S S 2の構築模式図、第3図はpBat-S S 3の構築模式図、第4図はpBat-S S 10の構築模式図、第5図はpBat-S S 49の構築模式図、第6図はpBat-S S 50およびpBat-S S 51の構築模式図、第7図はpM M 107の構築模式図、第8図はpM M 105の構築模式図、第9図は本発明の発現プラスミドで形質転換された形質転換体により発現されたタンパク質、バトロキソピンのN末端付近のDNA配列およびそれから推定されるアミノ酸配列およびそれから推定されるプロセッシング部位を示す模式図、第10図は天然バトロキソピンをコードするDNAの配列式およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す模式図である。

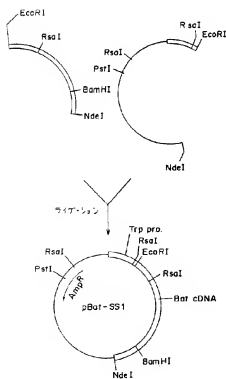
特許出願人 藤沢薬品工業株式会社

代理人 弁理士 青山 傑 (外2名)

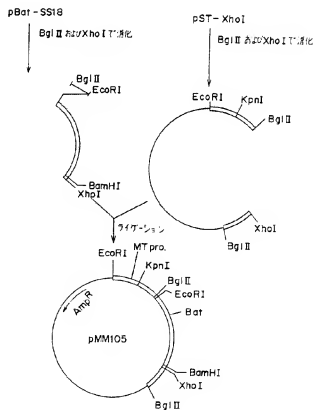
第 1 図 (1)



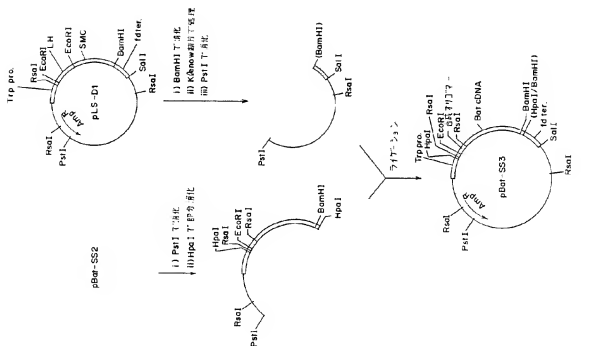
第 1 図 (2)



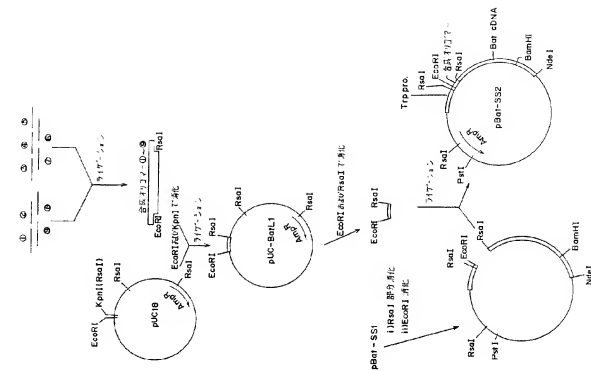
第 8 図 (2)



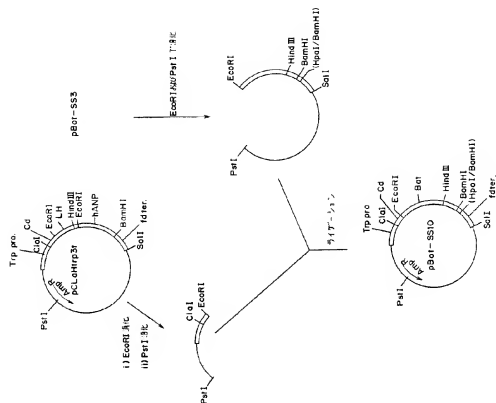
第 3 図



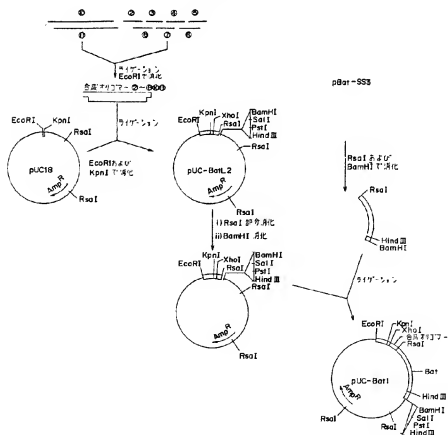
第 2 図



第 4 図

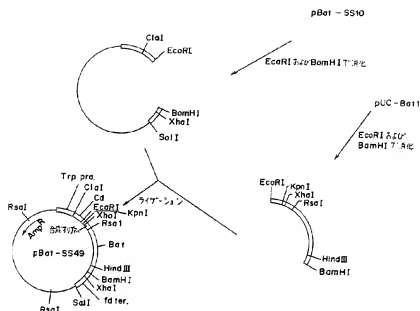


第 5 図 (1)

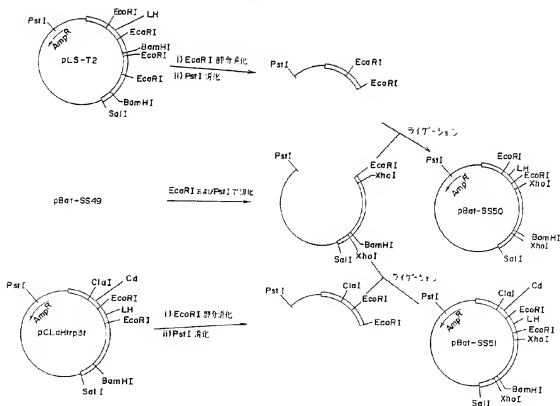




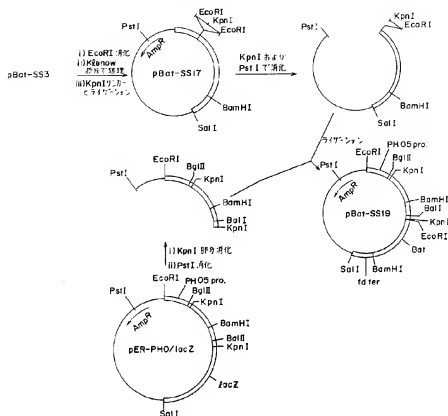
第 5 図 (2)



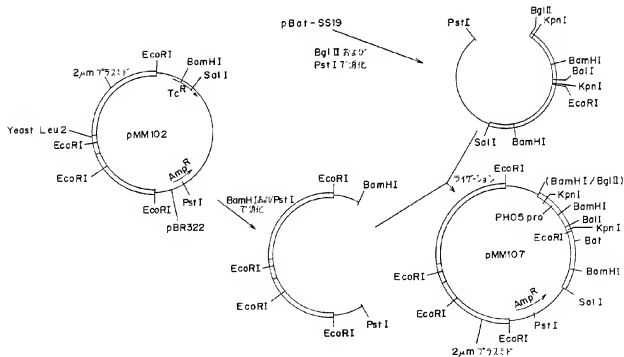
第 6 図



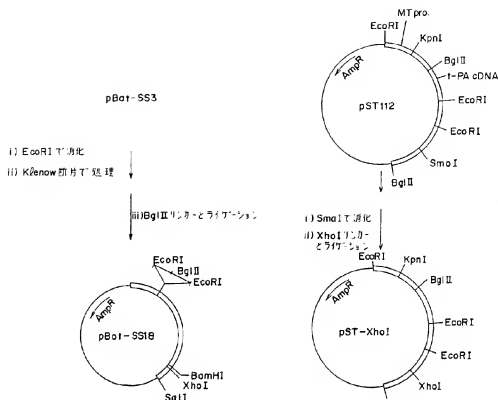
第7図(1)



第7図(2)



第 8 図 (1)



第 9 図

大腸菌 (pBat-SS49, pBat-SS50, pBat-SS51)

10 20 30 40 50 60  
 ATGGATGATCTGCCGACTGTAGAACTGCAAGTGGTACCTCGAGTGATTGGAGGTGATGAA.....  
 MetAspAspLeuProThrValGluLeuGlnValValProArgValIleGlyGlyAspGlu.....

第Ⅷ因子様配列

成熟バトロキソピン配列

→ 発見タンパク質 (Bat の C 末端まで)

酵母 (pNM107)

10 20 30 40  
 TTGGCCAAATGCAGGTACCGAATTCATGGTCATTGGAGGTGATGAA.....  
 LeuAlaAsnAlaGlyThrGluPheMetValIleGlyGlyAspGlu.....

PHOS配列

リンカー配列

成熟バトロキソピン配列

→ 発見タンパク質 (Bat の C 末端まで)

動物細胞 (pNM165)

10 20 30 40  
 AGAAGAGGAGCCAGATCTGAAATTCATGGTCATTGGAGGTGATGAA.....  
 ArgArgGlyAlaArgSerGluPheMetValIleGlyGlyAspGlu.....

tPA配列

リンカー配列

成熟バトロキソピン配列

→ 発見タンパク質 (Bat の C 末端まで)

▲はプロセッシング部位

第10圖(1)

```

5'-CGTAACTCTGCCAGCGTTCCAGATTGTTGGCCAAACAGCTGCTTAATTTGATCAAAATAAGTGCTGCTTGATCA
      20          40          60
      80          100         120         140
AGAAGTCTCCGCTTGGGTTATCTGATTAGGTIGATACGGTATCTCAGTTTAAAGTAAGGAGCTGGGATCTTCCAG
      160         180         200         220
GCAAAACAGCTTCCACGCAGAGTTGAAGCTATGTTGCTGATCAGAGTGATAGCAAACTTCTGATATTACAGGTT
      HetValLeuIleArgValIleAlaLeuLeuIleLeuGlnVal
      -24      -20
      240         260         280         30
TCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAACCTGGTCAATTGGAGGTGATGAATGTGACATAAATGAACATCCTTTCCTTGCA
SerTyrAlaGlnLysSerSerGluLeuValIleGlyGlyAspGluCysAspIleAsnGluHisProPheLeuAla
      -1 1
      0          320         340         360
TTCATGTACTACTCTCCCGGTATTCTGTGGTATGACTTTGATCAACCAGGAATGGGTGCTGACCGGCTGCACAC
PheHetTyrTyrSerProArgTyrPheCysGlyMetThrLeuIleAsnGlnGluTrpValLeuThrAlaAlaHis
      20
      380         400         420         440         40
TGTAAACAGGACATTTATGGCCATACACCTTGGTAAACATGCCGGAAGTGTAGCAAAATTATGATGAGGTGGTAAGA
CysAsnArgArgPheHetArgIleHisLeuGlyLysHisAlaGlySerValAlaAsnTyrAspGluValValArg
      60
      460         480         500         520
TACCCAAAGGAGAGGTTCAATTGTGCCAATAAGAAAAAATGTTCATAACGGACAGAGACATTATGTTGATCAGG
TyrProLysGluLysPheIleCysProAsnLysLysLysAsnValIleThrAspLysAspIleHetLeuIleArg
      80

```

第10圖(2)

```

      540         560         580         60
CTGGACAGACCTGTCAAAAACAGTGAACACATCGCGCCTCTCAGCTTGCTTCCAACTCCAGTGTGGGCTCA
LeuAspArgProValLysAsnSerGluHisIleAlaProLeuSerLeuProSerAsnProProSerValGlySer
      0          100
      620         640         660
GTTTCCGCTATTATGGGATGGGGCGCAATCACAACCTTGAAGACACTTATCCGATGTCCCTCATTTGTGCTAAC
ValCysArgIleHetGlyTrpGlyAlaIleThrThrSerGluAspThrTyrProAspValProHisCysAlaAsn
      120         140
      680         700         720         740
ATTAACTCTTCAATAATACGGTGTGTCTGGAAGCTTACAATGGGTTGCCGGCGAAAAACATTTGTGCGAGGTGTC
IleAsnLeuPheAsnAsnThrValCysArgGluAlaTyrAsnGlyLeuProAlaLysThrLeuCysAlaGlyVal
      160
      760         780         800         820
CTGCAAGGAGGCATAGATACATGTGGGGGTGACTCTGGGGGACCCCTCATCTGTAATGGACAATTCAGGGGCATT
LeuGlnGlyGlyIleAspThrCysGlyGlyAspSerGlyProLeuIleCysAsnGlyGlnPheGlnGlyIle
      180
      840         860         880         90
TTATCTTGGGGAAGTGATCCCTGTGCCGAACCGCTAAGCCTGCCTTCTACACCAAGGTCTTTGATTATCTTCCC
LeuSerTrpGlySerAspProCysAlaGluProArgLysProAlaPheTyrThrLysValPheAspTyrLeuPro
      200
      920         940         960
TGGATCCACAGCATTATTGCAAGGAATAAACTGCCACTTGCCCGTAAACCTTTGAAAAGGTTAAGAGGCGAA
TrpIleGlnSerIleIleAlaGlyAsnLysThrAlaThrCysPro
      220
      980         1000        1020        1040
AGTGTTAAACATATTAGTTCATCTCTTATATCCCTAACCATATCCAACTACATTGGAATATATCCAGATCGT

```

## 第10図 (3)

```

      1060      1080      1100      1120
AAGCTTTTTTTAGACTCAAATAGGACTGCCCTTTGGAATAAGAAATGCTCAAAACAGTCGTGCAGGCATGATGAGG

      1140      1160      1180      120
CCTGTTTTATGGTGAGGTGCAAAATTTCTGACTCTAAAAAGGACCATTCCAAATATTTAAACCATTCTGTCCA

0      1220      1240      1260
CTTCTGGGACAGTGTTGGTCTCTGAGCTTGTCTTCTTGACAGCGTTTCACTACCCAGCTAGGTAAT

      1280      1300      1320      1340
ATCATCAGTGCTAGAAATATTCTTCTATGTTAGTTTTGTGGCATTTACAATACGCTCATATGTAGCCATGCAGT

      1360      1380      1400      1420
CACCCACAAACATATCCATGTACCCGGTCCACCGTTGCATAAAAAAGGATCCAGATTAACCTCCACTTCCCAA

      1440      1460      1480      150
TCACGAAATAGAATCTTTTGAGAATCATGTTTTATGTAATTTCTCAGGTATCCACAGCAATAAAATTGTATAAA

0      1520
TCGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

```

第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号
// A 61 K 37/54	ACB	8615-4C
(C 12 N 9/64		
(C 12 R 1:19)		
(C 12 N 9/64		
(C 12 R 1:865)		
(C 12 N 9/64		
(C 12 R 1:91)		
(C 12 N 1/19		
(C 12 R 1:865)		
(C 12 N 1/21		
(C 12 R 1:19)		
(C 12 N 5/10		
(C 12 R 1:91)		